

( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: June 2, 2000  
Application Number: Japanese Patent Application  
No. 166579/2000  
Applicant(s): NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

April 20, 2001

Commissioner,  
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3032777

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

JC903 U.S. PRO  
09/870821  
06/01/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 6月 2日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-166579

出 願 人

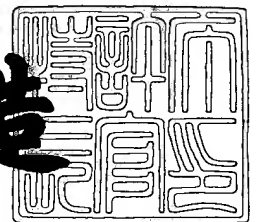
Applicant(s):

株式会社日本触媒

2001年 4月20日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3032777

【書類名】 特許願

【整理番号】 P00-0421

【提出日】 平成12年 6月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 13/00

【発明の名称】 光学活性シアノヒドリンの製造方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒内

【氏名】 仙波 尚

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒内

【氏名】 ▲土▼▲橋▼ 幸生

【特許出願人】

【識別番号】 000004628

【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406568

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性シアノヒドリンの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 青酸を 1.5 M の濃度で水と実質的に混和しない有機溶媒に溶解した溶液と純水とを、有機相と水相に二相分離する比率で混合した後、静置して得られる水相の pH が 5 以下を示す、安定剤として酸性物質を含む青酸、及びカルボニル化合物を原料として、酵素反応により光学活性シアノヒドリンを合成するに際し、当該安定剤の酵素に対する阻害作用を低減させるための処理を行った青酸を原料として用いることを特徴とする光学活性シアノヒドリンの製造方法。

【請求項 2】 青酸及びカルボニル化合物を原料として、酵素反応により光学活性シアノヒドリンを合成する方法において、青酸を一旦水と実質的に混和しない有機溶媒に溶解して、青酸有機溶媒溶液を調製し、次いで当該青酸有機溶媒溶液に対して緩衝液を飽和量以上加え、混合した後、青酸有機溶媒溶液相を回収し、反応に用いることを特徴とする光学活性シアノヒドリンの製造方法。

【請求項 3】 緩衝液が pH 4 ～ 7 の範囲で緩衝能を有する緩衝液である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 酵素反応がヒドロキシニトリルリアーゼを用いる酵素反応である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カルボニル化合物及び青酸（シアン化水素酸）を原料として、酵素反応により光学活性シアノヒドリンを合成する反応に関する。

【0002】

【従来の技術】

カルボニル化合物及び青酸を原料として、ヒドロキシニトリルリアーゼ等の酵素を触媒に用い、光学活性シアノヒドリンを合成する反応については多くの報告がある。しかし、いずれも工業的に生産されている青酸に安定剤が含まれており

、しかも、その安定剤がヒドロキシニトリルリアーゼの活性に重大な影響を及ぼすことについては全く言及されていない。この理由として、これまでの報告例が工業的に生産された青酸ではなく、実験室内でごく少量調製された青酸であるため、安定剤を含まないためにこの事実気がつかなかったこと、また、反応系に添加する青酸が低濃度である場合には、安定剤の影響が出難いことなどから、この事実について知られていなかったためであろうことが考えられる。

## 【 0 0 0 3 】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、カルボニル化合物及び青酸を原料として、ヒドロキシニトリルリアーゼ等の酵素を触媒に用い、光学活性シアノヒドリンを合成するに際し、工業的に有利な方法を提供することを目的とする。

## 【 0 0 0 4 】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、工業的に利用可能な青酸に安定剤として含まれている酸性物質（亜硫酸や硫酸）がヒドロキシニトリルリアーゼ等の酵素の活性を阻害しており、この安定剤の阻害作用を低減させることにより、ヒドロキシニトリルリアーゼ等の酵素の寿命を大幅に延長することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【 0 0 0 5 】

即ち、本発明は、以下の発明を包含する。

（１）青酸を 1. 5 M の濃度で水と実質的に混和しない有機溶媒に溶解した溶液と純水とを、有機相と水相に二相分離する比率で混合した後、静置して得られる水相の pH が 5 以下を示す、安定剤として酸性物質を含む青酸、及びカルボニル化合物を原料として、酵素反応により光学活性シアノヒドリンを合成するに際し、当該安定剤の酵素に対する阻害作用を低減させるための処理を行った青酸を原料として用いることを特徴とする光学活性シアノヒドリンの製造方法。

## 【 0 0 0 6 】

（２）青酸及びカルボニル化合物を原料として、酵素反応により光学活性シアノヒドリンを合成する方法において、青酸を一旦水と実質的に混和しない有機溶媒

に溶解して、青酸有機溶媒溶液を調製し、次いで当該青酸有機溶媒溶液に対して緩衝液を飽和量以上加え、混合した後、青酸有機溶媒溶液相を回収し、反応に用いることを特徴とする光学活性シアノヒドリンの製造方法。

(3) 緩衝液が pH 4～7 の範囲で緩衝能を有する緩衝液である前記 (2) に記載の方法。

(4) 酵素反応がヒドロキシニトリルリアーゼを用いる酵素反応である前記 (1) ～ (3) のいずれかに記載の方法。

【0007】

#### 【発明の実施の形態】

本発明に用いるヒドロキシニトリルリアーゼとは、シアン化水素とカルボニル化合物とから光学活性なシアノヒドリンを合成する活性を有するものを意味し、R 体のシアノヒドリンを合成するヒドロキシニトリルリアーゼ ((R) - ヒドロキシニトリルリアーゼ) としては、アーモンド (*Prunus amygdalus*) などのバラ科植物由来の (R) - ヒドロキシニトリルリアーゼ、アマ科植物由来の (R) - ヒドロキシニトリルリアーゼ、S 体のシアノヒドリンを合成するヒドロキシニトリルリアーゼ ((S) - ヒドロキシニトリルリアーゼ) としては、モロコシ (*Sorghum bicolor*) などのイネ科植物由来の (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼ、キャッサバ (*Manihot esculenta*)、パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) などのトウダイグサ科植物由来の (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼ、キシメニア (*Ximenia americana*) などのボロボロノキ科植物由来の (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼなどが例示できる。

【0008】

前記酵素は酵素を含む生物組織からの抽出によって調製することができるが、前記酵素の遺伝子をクローニングし、当該遺伝子を組み込んで作成した遺伝子組換え生物によっても生産することができる。

【0009】

前記酵素は、酵素粉末状、酵素液状、適当な担体に固定化してなる固定化酵素などの状態のものを使用することができる。酵素を固定化する方法としては、種々の方法があるが、例えば、多孔性の無機担体、セルロースなどの繊維状の担体

、高分子化合物からなる担体などが挙げられ、具体的には、多孔性のセラミック粒子、多孔性のシリカゲル粒子、ゼオライト系粒子、寒天、アルギン酸カルシウム、キトサンなどの天然高分子ゲル、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコールなどの合成高分子ゲルなどが例示できるが、これらに限定されるものではない。酵素の固定化方法としては、特に制限はなく、例えば、担体に酵素液を吸収させる方法、酵素液と担体とを混合し、酵素を吸着固定する方法、酵素を包括固定化する方法、酵素を架橋剤で架橋する方法等が挙げられる。

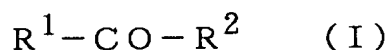
## 【 0 0 1 0 】

本発明においては、光学活性シアノヒドリンの製造原料としてカルボニル化合物及び青酸（シアン化水素酸）を用いる。

ここでカルボニル化合物とは、アルデヒド又はケトンをいい、具体的には、次式（I）：

## 【 0 0 1 1 】

## 【化 1】



（式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、互いに異なり、それぞれ水素原子又は炭素数 2 以下（2 以下）の 1 価の炭化水素基を表し、前記炭化水素基中、 $-CH_2-$ 並びに $-CH_3$ の $CH_2$ はカルボニル基、スルホニル基、 $-O-$ 又は $-S-$ で置き換えられていてもよく、 $=CH_2$ は $=O$ 又は $=S$ で置き換えられていてもよく、また $-CH_2-$ の $C-H$ 、 $-CH_3$ の $C-H$ 、 $>CH-$ の $C-H$ 、 $=CH-$ の $C-H$ 並びに $=CH_2$ の $C-H$ は、 $N$ 又は $C-H$ ハロゲンで置き換えられていてもよく、また、 $R^1$ 及び $R^2$ は、共同して非対称の 2 価の基を表してもよい。）

で示される。

## 【 0 0 1 2 】

前記式（I）において、炭素数 2 以下（2 以下）の 1 価の炭化水素基とは、直鎖状又は分岐状の鎖状炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある単環式炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある多環式炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のあるスピロ炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある環集合構造の炭化水素基、あるいは、前記の環式炭化水素基が置換した鎖状炭化水素基のいずれをも含む。また、飽和な炭化水



素基並びに不飽和な炭化水素基のいずれをも含むが、不飽和な炭化水素基において、 $C=C=C$ のアレン構造を含む基は除く。直鎖状又は分岐状の鎖状炭化水素基としては、例えば、飽和な鎖状炭化水素基である、炭素数 1 以上の直鎖状アルキル基、炭素数 3 以上の分岐状アルキル基、不飽和な鎖状炭化水素基である、炭素数 2 以上の直鎖状アルケニル基、炭素数 3 以上の分岐状アルケニル基、炭素数 3 以上の直鎖状アルキニル基、炭素数 4 以上の分岐状アルキニル基、炭素数 4 以上の直鎖状アルカジエニル基、炭素数 5 以上の分岐状アルカジエニル基などを例示することができる。単環式炭化水素基としては、例えば、飽和な単環式炭化水素基である、炭素数 3 以上の側鎖のないシクロアルキル基、総炭素数 4 以上の側鎖のあるシクロアルキル基、不飽和な単環式炭化水素基である、炭素数 4 以上の側鎖のないシクロアルケニル基、総炭素数 5 以上の側鎖のあるシクロアルキニル基、炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルカジエニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルカジエニル基などを例示することができる。不飽和な単環式又は多環式炭化水素基としては、芳香族炭化水素基、例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、9-アントリル基など総炭素数 6～22 の側鎖のない芳香族基、総炭素数 7 以上の側鎖のある芳香族基、更には、環集合構造の炭化水素基でもある、炭素数 12 のフェニルフェニル基、総炭素数 13 以上の側鎖のあるフェニルフェニル基を例示することができる。また、多環式炭化水素基としては、炭素数 6 以上の側鎖のない縮合環式炭化水素基、総炭素数 7 以上の側鎖のある縮合環式炭化水素基、炭素数 7 以上の側鎖のない架橋環式炭化水素基、総炭素数 8 以上の側鎖のある架橋環式炭化水素基、総炭素数 9 以上の側鎖のないスピロ炭化水素基、総炭素数 10 以上の側鎖のあるスピロ炭化水素基などを例示することができる。なお、前記の側鎖のない縮合環式炭化水素基において、縮合する環の一つがベンゼン環である場合、その総炭素数が 9 以上となるものを挙げることができ、前記の側鎖のある縮合環式炭化水素基において、縮合する環の一つがベンゼン環である場合、その総炭素数が 10 以上となるものを挙げるができる。環集合構造の炭化水素基としては、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキルシクロアルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキルシクロアルキル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキリデンシクロアルキル基、総

炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキリデンシクロアルキル基などを例示することができる。なお、これらの環式炭化水素において、側鎖のあるとは、環上に鎖状炭化水素基が置換していることを意味する。前述する環式炭化水素基が置換した鎖状炭化水素基としては、総炭素数 7 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 8 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 9 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 10 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 8 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルカジエニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルカジエニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 12 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 4 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 5 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 7 以上の側鎖のないシクロ

アルキル基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルカジエニル基などを例示することができる。

## 【0013】

なお、以下においては、側鎖のない芳香族基、側鎖のある芳香族基、並びに、フェニルフェニル基又は側鎖のあるフェニルフェニル基などを併せて、アリール基といい、このアリール基で置換された直鎖状又は分岐状のアルキル基をアラルキル基という。他の環式炭化水素基に関しても、特に明記しない場合、環上に側鎖のないものとあるものを併せて指す場合には、単にシクロアルキル基等の名称を用いる。鎖状炭化水素基についても、直鎖状のものと分岐状のものを併せて指す場合には、単にアルキル基等の名称を用いる。

## 【0014】

前記炭化水素基中、 $-\text{CH}_2-$ がカルボニル基、スルホニル基、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ で置き換えられると、それぞれケトン、スルホン、エーテル又はチオエーテルの構造が導入され、 $-\text{CH}_3$ の $-\text{CH}_2-$ がカルボニル基、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ で置き換わると、それぞれホルミル基（アルデヒド）、水酸基又はメルカプト基に変わり、あるいは、末端の $=\text{CH}_2$ が $=\text{O}$ 又は $=\text{S}$ に置き換わると、ケトン、チオケトンの構造が導入されることを意味し、また、 $-\text{CH}_2-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $-\text{NH}-$ となり、 $>\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $>\text{N}-$ となり、 $=\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $=\text{N}-$ となり、末端の $-\text{CH}_3$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $-\text{NH}_2$ が導入され、 $=\text{CH}_2$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $=\text{NH}$ となる。また、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $=\text{CH}-$ 、 $\equiv\text{CH}$ 又は $>\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{C}-\text{ハロゲン}$ で置き換えられると、当該炭素上へハロゲン原子を置換することになる。なお、炭素鎖中における $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $\text{N}$ への置き換えは、当該炭化水素基に対する、それぞれオキサ置換、チア置換、アザ置換に当たり、例えば、炭化水素環の環の骨格炭素で起こると、炭化水素環のそれぞれ含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環への変換となる。該炭化水素基中、 $\text{CH}_2$ 並びに $\text{C}-\text{H}$ におけ

る置き換えは、それぞれ独立に行われてよく、加えて、前記の置き換えを行った後、なお当該炭素上に $\text{CH}_2$ 又は $\text{C}-\text{H}$ が残存する際には、更に置き換えがなされてもよい。更には、前記の置き換えにより、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ の $-\text{CO}-\text{O}-\text{H}$ ；カルボン酸構造への変換などもなされる。

## 【 0 0 1 5 】

本明細書において、ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を指すが、フッ素原子、塩素原子、臭素原子が好ましい。

従って、前記炭化水素基としては、鎖状炭化水素基並びに環式炭化水素基など環構造を有する炭化水素基のいずれをも選択でき、例えば、飽和鎖状炭化水素基である直鎖状又は分岐状のアルキル基、不飽和鎖状炭化水素基である直鎖状又は分岐状のアルケニル基、直鎖状又は分岐状のアルキニル基、直鎖状又は分岐状のアルカジェニル基など、飽和な環式炭化水素基であるシクロアルキル基、不飽和な環式炭化水素基であるシクロアルケニル基、シクロアルキニル基、シクロアルカジェニル基など、芳香族炭化水素基であるアリール基、アラルキル基、アリーラルケニル基などが挙げられる。

## 【 0 0 1 6 】

更に詳しくいえば、直鎖状又は分岐状のアルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、1-メチルプロピル基、ペンチル基、1-メチルブチル基、ヘキシル基、1-メチルペンチル基、ヘプチル基、1-メチルヘキシル基、1-エチルペンチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、2-メチルプロピル基、2-メチルブチル基、3-メチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、4-メチルペンチル基、メチルヘキシル基、メチルヘプチル基、メチルオクチル基、メチルノニル基、1, 1-ジメチルエチル基、1, 1-ジメチルプロピル基、2, 6-ジメチルヘプチル基、3, 7-ジメチルオクチル基、2-エチルヘキシル基など、シクロアルキルアルキル基としては、シクロペンチルメチル基、シクロヘキシルメチル基など、シクロアルキル基としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、メチルシクロペンチル基、シクロヘキシル基、メチルシクロヘキシル基、シクロヘプチル基、

シクロオクチル基など、ビシクロアルキル基としては、ノルボルニル基、ビシクロ[2. 2. 2]オクチル基、アダマンチル基などが挙げられる。直鎖状又は分岐状のアルケニル基としては、例えばビニル基、アリル基、クロチル基(2-ブテニル基)、イソプロペニル基(1-メチルビニル基)など、シクロアルケニル基又はシクロアルカジエニル基としては、シクロペンテニル基、シクロペンタジエニル基、シクロヘキセニル基、シクロヘキサンジエニル基などが挙げられる。直鎖状又は分岐状のアルキニル基としては、例えばエチニル基、プロピニル基、ブチニル基などが挙げられる。アリール基としては、例えばフェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、2-フェニルフェニル基、3-フェニルフェニル基、4-フェニルフェニル基、9-アントリル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、トリメチルフェニル基、エチルフェニル基、メチルエチルフェニル基、ジエチルフェニル基、プロピルフェニル基、ブチルフェニル基などが挙げられる。アラルキル基としては、例えばベンジル基、1-ナフチルメチル基、2-ナフチルメチル基、フェネチル基(2-フェニルエチル基)、1-フェニルエチル基、フェニルプロピル基、フェニルブチル基、フェニルペンチル基、フェニルヘキシル基、メチルベンジル基、メチルフェネチル基、ジメチルベンジル基、ジメチルフェネチル基、トリメチルベンジル基、エチルベンジル基、ジエチルベンジル基などが挙げられる。アリールアルケニル基としては、例えばスチリル基、メチルスチリル基、エチルスチリル基、ジメチルスチリル基、3-フェニル-2-プロペニル基などが挙げられる。

#### 【0017】

前記炭化水素基中の $\text{CH}_2$ がカルボニル基、スルホニル基、O又はSで、又はC-HがN又はC-ハロゲンで置き換えられた基としては、ケトン、アルデヒド、カルボン酸、スルホン、エーテル、チオエーテル、アミン、アルコール、チオール、ハロゲン、複素環(例えば、含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環)などの構造を一つ以上含む基が挙げられる。なお、含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環とは、環式炭化水素基の環骨格の炭素がそれぞれ酸素、硫黄、窒素で置き換わるものを意味し、更には、これらヘテロ原子置換が二種以上ある複素環であってもよい。前記の置換を有する炭化水素基としては、例えば、ケト

ン構造のアセチルメチル基、アセチルフェニル基；スルホン構造のメタンスルホニルメチル基；エーテル構造のメトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、メトキシプロピル基、ブトキシエチル基、エトキシエトキシエチル基、メトキシフェニル基、ジメトキシフェニル基、フェノキシメチル基；チオエーテル構造のメチルチオメチル基、メチルチオフェニル基；アミン構造のアミノメチル基、2-アミノエチル基、2-アミノプロピル基、3-アミノプロピル基、2, 3-ジアミノプロピル基、2-アミノブチル基、3-アミノブチル基、4-アミノブチル基、2, 3-ジアミノブチル基、2, 4-ジアミノブチル基、3, 4-ジアミノブチル基、2, 3, 4-トリアミノブチル基、メチルアミノメチル基、ジメチルアミノメチル基、メチルアミノエチル基、プロピルアミノメチル基、シクロペンチルアミノメチル基、アミノフェニル基、ジアミノフェニル基、アミノメチルフェニル基；含酸素複素環のテトラヒドロフラニル基、テトラヒドロピラニル基、モルホリルエチル基；含酸素複素芳香環のフリル基、フルフリル基、ベンゾフリル基、ベンゾフルフリル基；含硫黄複素芳香環のチエニル基；含窒素複素芳香環のピロリル基、イミダゾリル基、オキサゾリル基、チアジアゾリル基、ピリジル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、ピラジニル基、テトラジニル基、キノリル基、イソキノリル基、ピリジルメチル基；アルコール構造の2-ヒドロキシエチル基、2-ヒドロキシプロピル基、3-ヒドロキシプロピル基、2, 3-ジヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシブチル基、3-ヒドロキシブチル基、4-ヒドロキシブチル基、2, 3-ジヒドロキシブチル基、2, 4-ジヒドロキシブチル基、3, 4-ジヒドロキシブチル基、2, 3, 4-トリヒドロキシブチル基、ヒドロキシフェニル基、ジヒドロキシフェニル基、ヒドロキシメチルフェニル基、ヒドロキシエチルフェニル基；チオール構造の2-メルカプトエチル基、2-メルカプトプロピル基、3-メルカプトプロピル基、2, 3-ジメルカプトプロピル基、2-メルカプトブチル基、3-メルカプトブチル基、4-メルカプトブチル基、メルカプトフェニル基；ハロゲン化炭化水素基である2-クロロエチル基、2-クロロプロピル基、3-クロロプロピル基、2-クロロブチル基、3-クロロブチル基、4-クロロブチル基、フルオロフェニル基、クロロフェニル基、ブromoフェニル基、ジフルオロフェニル基、ジクロロフェニル

基、ジブロモフェニル基、クロロフルオロフェニル基、トリフルオロフェニル基、トリクロロフェニル基、フルオロメチルフェニル基、トリフルオロメチルフェニル基；アミン構造とアルコール構造を有する2-アミノ-3-ヒドロキシプロピル基、3-アミノ-2-ヒドロキシプロピル基、2-アミノ-3-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-2-ヒドロキシブチル基、2-アミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-2-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-3-ヒドロキシブチル基、2, 4-ジアミノ-3-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-2, 4-ジヒドロキシブチル基、2, 3-ジアミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-2, 3-ジヒドロキシブチル基、3, 4-ジアミノ-2-ヒドロキシブチル基、2-アミノ-3, 4-ジヒドロキシブチル基、アミノヒドロキシフェニル基；ハロゲンと水酸基で置換された炭化水素基であるフルオロヒドロキシフェニル基、クロロヒドロキシフェニル基；カルボン構造のカルボキシフェニル基などが挙げられる。

## 【0018】

$R^1$ 及び $R^2$ で表される非対称の2価の基としては、特に制限はなく、例えば、ノルボルナン-2-イリデン、2-ノルボルネン-5-イリデンが挙げられる。

前記式(I)で示されるカルボニル化合物としては、例えば、ベンズアルデヒド、m-フェノキシベンズアルデヒド、p-メチルベンズアルデヒド、o-クロロベンズアルデヒド、m-クロロベンズアルデヒド、p-クロロベンズアルデヒド、m-ニトロベンズアルデヒド、3, 4-メチレンジオキシベンズアルデヒド、2, 3-メチレンジオキシベンズアルデヒド、フェニルアセトアルデヒド、フルフラール等の芳香族アルデヒド；アセトアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、バレルアルデヒド、シクロヘキサンアルデヒド等の脂肪族アルデヒド；エチルメチルケトン、ブチルメチルケトン、メチルプロピルケトン、イソプロピルメチルケトン、メチルペンチルケトン、メチル(2-メチルプロピル)ケトン、メチル(3-メチルブチル)ケトン等の飽和脂肪族ケトン；メチル(2-プロペニル)ケトン、(3-ブテニル)メチルケトン等の不飽和脂肪族ケトン；(3-クロロプロピル)メチルケトン等のアルキル(ハロアルキル)ケトン；2-(アルコキシカルボニルアミノ)-3-シクロヘキシルプロピオンアル

デヒド等の 2-（保護アミノ）アルデヒド；3-メチルチオプロピオンアルデヒド等のアルキルチオ脂肪族アルデヒドが挙げられる。

## 【0019】

本発明においては、青酸としては安定剤として酸性物質を含む青酸を用いる。前記安定剤とは、大量生産された青酸の重合などによる変質を抑制し、品質を安定に保持するために添加されている物質で亜硫酸、硫酸などの酸性物質を意味する。

本発明に用いる安定剤として酸性物質を含む青酸としては、青酸を 1.5M の濃度で水と実質的に混和しない有機溶媒に溶解した溶液と純水とを、有機相と水相に二相分離する比率で混合した後、静置して得られる水相の pH が 5 以下を示すものを意味し、当該 pH が 4 以下を示すものに本発明の方法を適用することが好ましい。

## 【0020】

本発明における、青酸に含まれる安定剤の酵素に対する阻害効果を低減させる方法としては、例えば、前記安定剤として酸性物質を含む青酸を一旦水と実質的に混和しない有機溶媒に溶解して、青酸有機溶媒溶液を調製し、次いで当該青酸有機溶媒溶液に対して緩衝液を飽和量以上加え、混合した後、有機相を回収し、反応に用いる方法；アルカリ性水溶液又は pH 4～7 で緩衝能を有する水性緩衝液を当該青酸に添加して、pH を 5～6 の間になるように調整する方法が挙げられる。

## 【0021】

前記安定剤の酵素に対する阻害効果を低減させる方法の好ましい手順の一例を以下に示す。

1. 通常、水と実質的に混和しない有機溶媒（既に水又は水性緩衝液で飽和されていてもよい）に安定剤を含む青酸を所定量添加する。
2. 緩衝液を前記溶液の飽和溶解量より過剰に添加、混合し、静置する。
3. 二相分離した有機相を分離し、反応に用いる。

## 【0022】

以上のような極めて簡単な方法によって工業生産された青酸に含まれる安定剤



の悪影響を効果的に除去することが可能になる。

シアン化水素の供給方法としては液体として供給する方法、気体として供給する方法のいずれをも採用することができる。

#### 【 0 0 2 3 】

前記の安定剤の酵素に対する阻害効果を低減させる方法に用いる緩衝液とは、酵素活性の最適 pH 付近において緩衝能を発揮する緩衝液を意味し、具体的には、クエン酸、グルタル酸、リンゴ酸、マロン酸、o-フタル酸、コハク酸などの塩等が挙げられ、通常 pH が 4 ~ 7、好ましくは 5 ~ 7 の範囲のものが用いられる。緩衝液の濃度は、所定量の青酸を溶解した有機溶媒と混合した後の水相の pH を 5 ~ 7 の範囲に維持することができる濃度が好ましい。

#### 【 0 0 2 4 】

本発明においては、反応原料の濃度を高め、生産性を高めるために、反応溶媒として、水と実質的に混和しない有機溶媒を用いる。ここで、「水と実質的に混和しない有機溶媒」とは、水に任意の割合で溶解する溶媒を除く有機溶媒を意味する。有機溶媒としては、水と実質的に混和せず、基質及び生成物を十分に溶解し、酵素反応に悪影響を与えないものであれば特に制限なく用いることができる。このような有機溶媒は、原料のアルデヒド又はケトンの物性、生成物であるシアノヒドリンの物性に応じて適宜選択することができる。

#### 【 0 0 2 5 】

水と実質的に混和しない有機溶媒としては、具体的には、ハロゲン化されていてもよい炭化水素系溶媒（例えば、直鎖状、分岐状又は環状の飽和又は不飽和脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素）、例えば、ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、塩化メチレン、クロロホルムなど；ハロゲン化されていてもよいアルコール系溶媒（例えば、直鎖状、分岐状又は環状の飽和又は不飽和脂肪族アルコール、アラルキルアルコール）、例えば、n-ブタノール、イソブタノール、t-ブタノール、ヘキサノール、シクロヘキサノール、n-アミルアルコールなど；ハロゲン化されていてもよいエーテル系溶媒（例えば、直鎖状、分岐状又は環状の飽和又は不飽和脂肪族エーテル、芳香族エーテル）、例えば、ジエチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル

、ジブチルエーテル、*t*-ブチルメチルエーテル、ジメトキシエタンなど；ハロゲン化されていてもよいエステル系溶媒（例えば、直鎖状、分岐状又は環状の飽和又は不飽和脂肪族エステル、芳香族エステル）、例えば、ギ酸メチル、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチル、プロピオン酸メチル等が挙げられ、これらを単独で用いてもまた2種以上を混合して用いてもよい。

## 【0026】

前記有機溶媒は、水又は水性緩衝液で飽和されていてもよい。また、更に過剰の水又は水性緩衝液を加えて有機溶媒相と水相との二相系を形成する溶液状態で使用してもよい。前記の有機溶媒を水又は水性緩衝液で飽和する方法としては、特に制限はないが、例えば、前記の有機溶媒と水又は水性緩衝液を二相を形成する割合で混合し、暫く攪拌した後、静置し、その有機層を用いる方法が挙げられる。ここで用いる水性緩衝液としては、特に制限はないが、例えば、前記の緩衝液が挙げられる。

## 【0027】

本発明は、工業的に生産され、安定剤を含む青酸を光学活性シアノヒドリンの合成反応に用いるにあたり、当該青酸に含まれる安定剤の酵素に対する悪影響を低減させる方法を提供するものであり、当該青酸を使用する形態については制限しない。即ち、本発明が提供する安定剤の悪影響を低減する方法を実施して得られる青酸は、水・有機溶媒混合系、有機溶媒系、有機溶媒水二相系、固定化酵素を使う反応系などのいずれの反応系においても効果的に使用することができる。

## 【0028】

固定化酵素及び基質の使用量、反応温度は、用いる基質に応じて適宜決定される。通常、固定化酵素の使用量は基質であるカルボニル化合物50mmolに対して1～1000単位、好ましくは10～500単位である。基質の濃度は、カルボニル化合物の場合は通常0.1～10mol/Lの範囲に設定し、シアン化水素は用いるカルボニル化合物に対して1～5倍モル、好ましくは1.1～3倍モルの濃度で添加する。本反応は基質濃度によって酵素活性及び反応速度が変化するので、用いるカルボニル化合物の種類に応じて適宜決定する。反応時間は、基質であるカルボニル化合物の転換率が80%以上、好ましくは90%以上に達するまでの

時間が適当であるが、この限りではない。反応温度は酵素の活性が十分発揮される温度であればよく、通常 0 ~ 4 0 °C、好ましくは 4 ~ 3 0 °C である。

#### 【 0 0 2 9 】

本発明方法によって生成された光学活性シアノヒドリンは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などによって、測定、定量することができ、必要に応じて、抽出、減圧蒸留、カラム分離などの通常的手段によって分離精製することができ、長時間保存する場合には安定剤を添加してもよい。

#### 【 0 0 3 0 】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

##### (調製例 1) (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

(S) - ヒドロキシニトリルリアーゼは、酵母サッカロマイセス・セレビシエを宿主として、キャッサバ由来の当該遺伝子をクローニングしたものを当該酵母へ遺伝子組換えして得た遺伝子組換え酵母を培養することによって調製した。当該遺伝子組換え酵母を YPD 培地 (酵母エキス 1 %、ペプトン 2 %、グルコース 2 %) 1 L で 2 4 時間当該遺伝子組換え酵母を培養し、回収した菌体を破碎して不溶分を除去した液を回収した。

#### 【 0 0 3 1 】

##### (調製例 2) 固定化 (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

調製例 1 の方法で調製した (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼ酵素液に、酵素活性 3 0 0 単位に対して 1 g の固定化担体 (多孔性シリカゲル、microbead silicagel 300A、富士シリシア化学製) を添加し、緩やかに一晩混合した。次いで、濾過して固定化酵素を回収し、これを以降の反応に用いた。

#### 【 0 0 3 2 】

##### (実施例 1)

t - ブチルメチルエーテル 6 1 0 g と安定剤として亜硫酸を含む青酸 4 1 g を混合したものに、0. 2 M クエン酸緩衝液 (pH 7) を 4 0 m l 添加し、攪拌混合した後、静置してから有機相を分離した。この有機相に調製例 2 で調製した固

定化酵素（6万単位）を添加し、次いでベンズアルデヒド106gを添加した。これを室温で攪拌することによって、（S）-マンデロニトリルの合成を行った。30分間反応させた後、反応液を回収し、HPLCによりアルデヒドの転換率を測定した。反応終了後、固定化酵素を回収し、前記と同じ操作で調製した基質液と回収した固定化酵素を再び混合し、同じ条件で繰り返し反応を行った。この検討の結果、反応を繰り返しても、酵素の活性は安定に保持され、11回の反応において、活性の低下は認められなかった（図1）。11回目の反応液2.5mlを採取し、純水5mlと混合して得た水相のpHは5であった。

## 【0033】

なお、原料として用いた、安定剤として亜硫酸を含む青酸を1.5Mの濃度でt-ブチルメチルエーテルに溶解した溶液と純水とを、有機相と水相に二相分離する比率（有機相：水＝1：2（v/v））で混合した後、静置して得られた水相のpHは2.9であった。

## 【0034】

## （比較例1）

10mMリン酸緩衝液（pH5）で飽和させたt-ブチルメチルエーテル610gと安定剤として亜硫酸を含む青酸41gを混合したものに調製例2で調製した固定化酵素（6万単位）を添加し、次いでベンズアルデヒド106gを添加した。これを室温で攪拌することによって、（S）-マンデロニトリルの合成を行った。30分間反応させた後、反応液を回収し、HPLCによりアルデヒドの転換率を測定した。反応終了後、固定化酵素を回収し、前記と同じ操作で調製した基質液と回収した固定化酵素を再び混合し、同じ条件で繰り返し反応を行った。この検討の結果、繰り返し反応5回目で活性が顕著に低下し、6回目でほぼ活性がなくなった（図1）。この時の反応液を2.5ml採取し、純水5mlと混合したときの水相のpHを測定したところ、3.5に低下していた。

## 【0035】

## 【発明の効果】

本発明によれば、ヒドロキシニトリルリアーゼ等の酵素の活性低下を抑制でき、酵素としての寿命を大幅に延長することができる。そのため、工業的に生産さ

れた安定剤を含む青酸を用いて、光学活性シアノヒドリンを安価に安定的に工業的生産が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

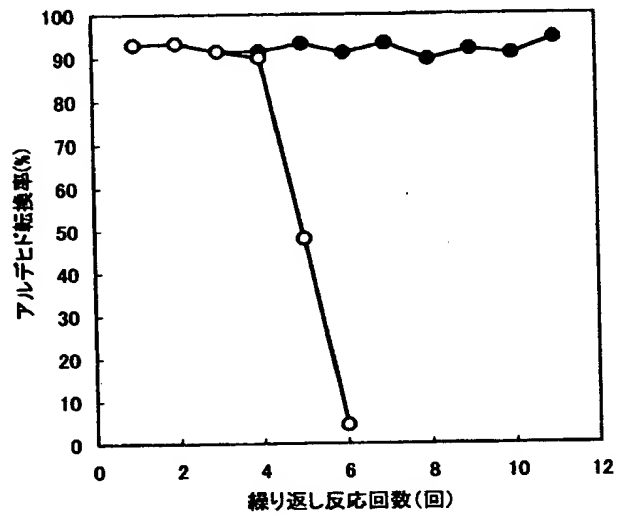
繰り返し反応の回数とアルデヒドの転換率との関係を示す図である。

【符号の説明】

- 実施例 1
- 比較例 1

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 カルボニル化合物及び青酸を原料として、ヒドロキシニトリルリアーゼ等の酵素を触媒に用い、光学活性シアノヒドリンを合成するに際し、工業的に有利な方法を提供する。

【解決手段】 青酸を 1.5 M の濃度で水と実質的に混和しない有機溶媒に溶解した溶液と純水とを、有機相と水相に二相分離する比率で混合した後、静置して得られる水相の pH が 5 以下を示す、安定剤として酸性物質を含む青酸、及びカルボニル化合物を原料として、酵素反応により光学活性シアノヒドリンを合成するに際し、当該安定剤の酵素に対する阻害作用を低減させるための処理を行った青酸を原料として用いることを特徴とする光学活性シアノヒドリンの製造方法；並びに青酸及びカルボニル化合物を原料として、酵素反応により光学活性シアノヒドリンを合成する方法において、青酸を一旦水と実質的に混和しない有機溶媒に溶解して、青酸有機溶媒溶液を調製し、次いで当該青酸有機溶媒溶液に対して緩衝液を飽和量以上加え、混合した後、青酸有機溶媒溶液相を回収し、反応に用いることを特徴とする光学活性シアノヒドリンの製造方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004628]

1. 変更年月日 1991年 6月11日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号  
氏 名 株式会社日本触媒
2. 変更年月日 2000年12月 6日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号  
氏 名 株式会社日本触媒